

福建闽侯福橘黑斑病病原菌的鉴定

兰成忠, 李本金, 李 炜, 赵 健, 陈庆河, 翁启勇
福建省农业科学院植物保护研究所, 福建 福州 350013

摘要: 柑橘黑斑病是柑橘的重要病害之一。本文通过病原菌的形态特征和致病性,并结合其 rDNA-ITS 区域序列及柯赫法则,对从福建省福州市闽侯县福橘果上分离的黑斑病病原菌进行了鉴定分析。结果表明:PDA 平板上的病原菌菌落生长缓慢,呈圆形凸起;分生孢子器近球形、黑色炭质;分生孢子单孢、无色,呈椭圆形,大小为(7~12) μm×(5~8) μm,分生孢子外包裹一层半透明凝胶状物质。结合序列比对分析结果,最终将分离的福橘果实黑斑病的病原菌鉴定为柑橘球座菌 *Guignardia citricarpa* Kiely。本研究为柑橘黑斑病的早期诊断和防治奠定了基础。

关键词: 福橘; 黑斑病; rDNA-ITS 序列; 鉴定

Identification of the pathogen causing citrus black spot disease on *Citrus reticulata* Blanco cv. Tangerina fruit in Minhou, Fujian Province

Cheng-zhong LAN, Ben-jin LI, Wei LI, Jian ZHAO, Qing-he CHEN, Qi-yong WENG
Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China

Abstract: Citrus black spot disease is one of the important diseases on citrus. In this paper, the pathogen causing the citrus black spot disease was identified on *Citrus reticulata* Blanco cv. Tangerina in Minhou County, Fujian Province, based on Koch's postulates and rDNA internal transcribed spacer(ITS) sequences. The sample was collected on July 2009. The colony growing slowly from the PDA medium plate was round and protuberant. The spherical pycnidium was black and the monadic conidiophore elliptic, colourless, (7~12) μm×(5~8) μm, surrounded by a layer of translucent gelatinous coat. The ITS sequence analysis proved that the pathogen was *Guignardia citricarpa* Kiely. This is the fourth confirmed record of this pathogen from China. This research laid a foundation for early diagnosis and treatment of citrus black spot disease.

Key words: *Citrus reticulata* Blanco cv. Tangerina; black spot disease; rDNA-ITS sequence; identification

柑橘黑斑病也称为黑星病,是柑橘的重要病害之一。此病也是我国出口预警重要病害及欧盟高度关注的检疫性病害,有该病症状的鲜果一旦被检出,将被禁止入境。以往柑橘黑斑病在我国柑橘产区零星发生,然而近年来逐渐加重并取代柑橘溃疡病,成为制约鲜果出口欧盟的重要病害(王卫芳等, 2008;胡佳等,2010)。福建省也有相关报道,以前只在柑橘上发生,近几年在柚子果实上也发现了该病的危害。该病菌虽然不为害果肉,但会严重影响果实品质和销售价值(Wallingford,2005;林石明等, 2010)。

国内研究表明,引起柑橘黑斑病病原菌的有性阶段为柑橘球座菌 *Guignardia citricarpa* Kiely,无性

阶段为柑橘茎点霉 *Phoma citricarpa* McAlpine(蒲占涓和黄茜斌, 2009;陈国庆等, 2010,张玉洁等, 2010)。但 Wulandari *et al.* (2009) 研究认为,亚洲(包括泰国、印尼和中国)柚类 *Citrus maxima* 上发生的柑橘黑斑病病原菌为新种(亚洲种) *Phyllosticta citriasiana* sp. nov. 林石明等(2010)研究表明,引起福建省漳州琯溪蜜柚黑斑病的病原菌也为该新种 *P. citriasiana* sp. nov。但有关福建闽侯福橘黑斑病病原菌的种类尚未见报道。为此,笔者通过传统的病原形态学,结合 rDNA-ITS 序列的比对分析,对福建省福橘果实上的柑橘黑斑病病原菌进行鉴定,以期为更好地开展柑橘黑斑病的早期诊断和防治工作奠定基础。

收稿日期:2011-01-19 接受日期:2011-02-09
基金项目:农业部公益性行业(农业)科研专项(200903034);福建省财政专项——福建省农业科学院科技创新团队建设基金(STIF-Y07)
通讯作者(Author for correspondence): 翁启勇, E-mail: wengqy@faas.cn
致谢:本论文在写作过程中得到了广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心植物检疫实验室王卫芳教授的精心指点,在此表示衷心感谢!

1 材料与方法

1.1 材料来源

柑橘黑斑病病果(福橘)采集于福建省福州市闽侯县荆溪镇龙台山柑橘园,采回的病果装入保鲜袋并放于 4 ℃ 冰箱内备用。

1.2 病原菌分离及单孢纯化

取病健交界处的组织,经 75% 乙醇表面消毒 1 min,无菌水漂洗 3 次,待表面水分晾干后置 PDA 培养基平板上,于 28 ℃ 黑暗条件下培养 5 d。镜检确定病原菌产生分生孢子器后,用灭菌载玻片将培养基平板上的分生孢子器刮至灭好菌的研磨器中,使用灭菌研磨棒将分生孢子器充分磨碎,然后加入适量的灭菌蒸馏水,将分生孢子浓度配制为约 1×10^4 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ 。用移液枪吸取 20 μ L 悬浮液于 PDA 培养基平板中,再用灭菌涂布棒将其涂布均匀,置于 28 ℃ 黑暗条件下培养 24 h。于超净工作台上,用显微镜观察 PDA 培养基平板上分生孢子萌发状况,用手术刀片将由单个分生孢子萌发形成的微小菌落连同周围的培养基一同切下,移入另一个 PDA 培养基平板上。新的 PDA 培养基平板上长出的菌落即为获得病原菌的单孢纯化菌株,经单孢纯化后的菌株保存于 PDA 斜面上,置于 4 ℃ 冰箱中贮存备用。

1.3 病原菌致病性测定

采用针刺和无伤口接种法,分别以病原菌的菌丝块和孢子悬浮液作为接种体,在柑橘果实(由青转黄的福橘)上进行致病性测定。选择健康无病斑的柑橘果,用 75% 酒精表面消毒,待果实表面酒精自然晾干后用于接种。针刺接种法:用灭菌的针头刺伤健康无病的柑橘果实表皮后,挑取 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 待测菌株的菌丝块于柑橘果实的伤口处;同时,用移液枪吸取 20 μ L 病原菌孢子悬浮液滴在另一个果实的伤口处。无伤口接种法:未对健康的柑橘果实表皮进行创伤,其余操作与针刺接种法相同。接种所用的病原菌孢子悬浮液浓度约为 1×10^6 个 $\cdot$ mL $^{-1}$,设清水处理为对照,在 28 ℃ 下,保湿 48 h,每隔 2 d 观察症状。将接种后发病的果实进行再分离,观察分离得到的病菌是否与原接种菌相同。

1.4 病原菌形态学特征观察

将病原菌移接于 PDA 培养基平板上,28 ℃ 下黑暗培养 7 d,记录菌落形态和颜色。同时,在显微镜下观察分生孢子器和分生孢子的形状、大小等。

1.5 病原菌 rDNA-ITS 扩增与序列分析

1.5.1 病原菌基因组 DNA 的提取 将 28 ℃ 黑暗条件培养 7 d 的待测菌株的菌丝用接种针挑取数小

块,接种于马铃薯液体摇瓶培养基[配制方法参照方中达(1979)]中,置于 28 ℃、120 r $\cdot$ min $^{-1}$ 的摇床上振荡培养 8 d。将液体培养基中的菌丝体用灭菌纱布过滤,分装在 2.0 mL 离心管中,并将管盖打开,置冷冻抽干机中将菌丝体中的水分充分抽干后,研磨成粉末备用。采用 CTAB 法(兰成忠等,2008)提取各供试菌株基因组 DNA。

1.5.2 rDNA-ITS 扩增与序列测定 采用真菌 ITS 通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGrGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')扩增该病原菌的 ITS 和 5.8S rDNA。50 μ L PCR 反应体系包括模板 DNA 溶液 2 μ L(约 10 ng)、10 $\times$ PCR buffer(带 Mg $^{2+}$) 5.0 μ L、2.5 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ dNTP 4.0 μ L、10.0 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ ITS1 和 ITS4 引物各 0.8 μ L、5 U $\cdot$ μ L $^{-1}$ *Taq* 酶 0.8 μ L,加 ddH $_2$ O 至 50 μ L。扩增反应程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 1 min、55 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测以后,克隆和测序的具体方法参照兰成忠等(2008)。

1.5.3 病原菌 rDNA-ITS 序列同源性比对分析 在 NCBI 网站上用 BLAST 软件对测序得到的 rDNA-ITS 核苷酸序列与 GenBank 中已知种属的相似序列同源性进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 柑橘黑斑病的症状

柑橘黑斑病通常发生在福橘果实的成熟始期,果色由青转黄阶段,病斑圆形黑褐色,周围有一晕圈(未熟青果上晕圈呈黄色,成熟果上晕圈为绿色)。发病初期病斑通常呈红色至棕色,近收获期病果症状更为典型:病斑中部稍凹陷,呈浅褐色至灰白色,直径一般为 1~3 mm;边缘深红至褐色,通常在病斑中部可见很多细小黑色稍凸起的粒点,即病菌的分生孢子器;发病严重时,多个病斑可愈合成不规则形的褐色至黑色大斑。

2.2 病原菌的致病性

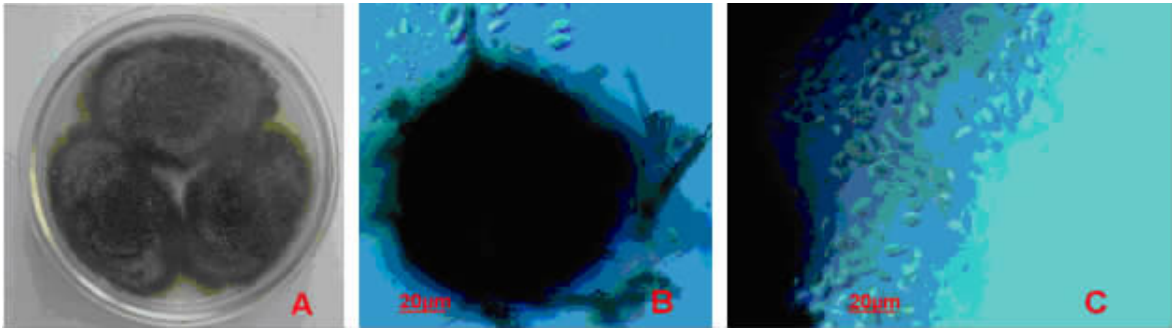
采用针刺和无伤口接种法将 8 个已纯化的菌株接种于健康的福橘果实上,7~11 d 后,接种菌丝块和分生孢子悬浮液的果实均能发病。针刺接种的果实发病比无伤口接种早 3~4 d;同等条件下,菌丝块接种的果实发病比分生孢子悬浮液接种早 2~3 d;病状与田间观察到的相同,对照果实不发病。将发病果实的病斑进行分离,再次获得与原分离菌一致的病原菌,根据柯赫法则(Koch,1884),证明接种菌为柑橘黑斑病的病原菌。

2.3 病原菌的形态特征

在 PDA 培养基平板上的病原菌菌落呈黑色、

平铺,边缘微呈裂瓣状(图1A),且生长比较缓慢。病原菌在培养过程中,菌落可产生黄色色素。28℃黑暗条件下培养7 d后,菌落直径为5.3~6.0 cm;8 d后菌落变成黑色、硬块状子座,子座上密生分生孢子器,分生孢子器近球形、黑色炭质(图1B)。分生孢子单孢、无色,呈椭圆形或卵形,大小为(7~12) μm×(5~8) μm,因分生孢子外包装透

明的黏状附属物不易分散而呈胶质流溢出(图1C)。病原菌的培养性状及分生孢子器、分生孢子的形态特征与王卫芳等(2008)、张玉洁等(2010)所报道的相同;同时与欧洲与地中海植物保护组织(OEPP/EPPO)2009年公布的柑橘黑斑病菌(柑橘球座菌*G. citricarpa* Kiely)诊断标准中所描述的一致。



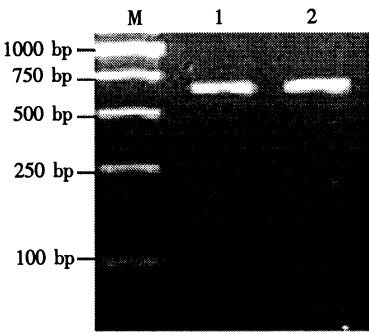
A. 菌落形态;B. 分生孢子器;C. 分生孢子。
A. Colonial morphology; B. Pycnidium; C. Conidiophore.

图1 柑橘黑斑病原菌的形态特征

Fig.1 Morphological characters of the pathogen of citrus black spot disease

2.4 病原菌 rDNA-ITS 的序列扩增及测序结果

本研究从供试的病原菌中挑选出1株形态特征典型的菌株118,以该菌株的基因组DNA为模板,用通用引物ITS1/ITS4进行PCR扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳检测,得到1个约600 bp的片段(图2)。克隆并测序了该菌的rDNA-ITS序列,该片段全长实际为632 bp。



M:标准DNA分子质量;1~2:菌株118。
M:DL2002 DNA marker; 1~2:Strain 118.

图2 菌株118 PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of strain 118

2.5 rDNA-ITS 序列同源性聚类分析

通过GenBank中的BLAST功能,将菌株118的rDNA-ITS序列(GenBank登录号:JF681132)与GenBank中已有的DNA序列进行同源性比较,发现与其同源性最高的170个ITS序列菌株均为柑橘球座菌。菌株118的ITS序列与已知柑橘球座菌序

列的同源性为99.8%(GenBank登录号:FJ538315、FJ538316、HQ008221、GU060465);与亚洲柑橘叶点霉*P. citriasiana*序列的同源性为96.1%(GenBank登录号:FJ538354~FJ538359);与球座菌属中相近种葡萄球座菌*G. bidwellii*、七叶树球座菌*G. aesculi*、番石榴黑星病菌*G. psidii*、山茶球座菌*G. camelliae*、芒果球座菌*G. mangiferae*、落叶松球座菌*G. laricina*、咖啡球座菌*G. coffeana*的ITS序列同源性为82.5%~87.2%(GenBank登录号:EU673223、AB095504、HQ328039、GU595026、HU807531、AB454293、DQ377878)。

序列比较分析显示,菌株118 ITS序列与柑橘球座菌(GenBank登录号:FJ538316)仅存在1个碱基差异,而与亚洲柑橘叶点霉(GenBank登录号:FJ538354)存在第69、79、84、100、131、174、189、191、193、236、247、257、277、555等14个位点上的碱基差异。进一步利用分子生物学软件Clustalx 2.0,按最大相似法构建系统发育进化树,结果显示,亚洲柑橘叶点霉同属于一个分支中;菌株118与柑橘球座菌(GenBank登录号:FJ538316)的遗传距离最近,位于系统发育树的同一个分支上,与球座菌属其他菌株的遗传距离较远(图3)。因此,综合病原菌的形态特征、致病性及ITS序列分析结果,最终确定引起福建省福橘果实黑斑病的病原菌为柑橘球座菌*G. citricarpa*。

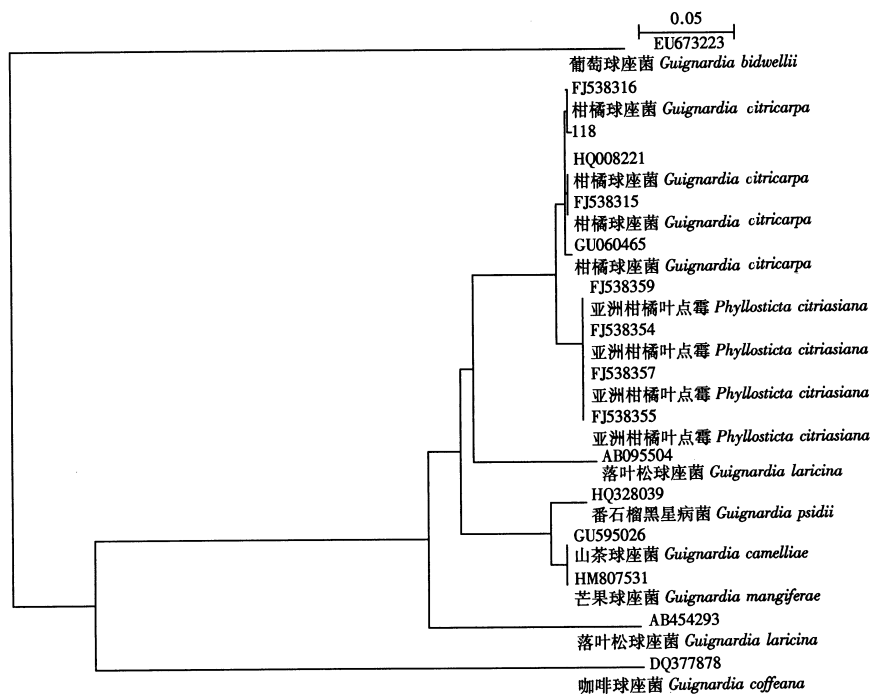


图 3 基于 rDNA-ITS 序列构建的菌株 118 和球座菌属其他菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain 118 and other species of *Guignardia* based on rDNA-ITS sequences

3 讨论

植物病原菌的准确诊断鉴定是植物检疫及植物病害研究的前提条件,对有效开展植物病害的防治工作具有重要意义。传统的病原菌鉴定方法主要依据其形态特征,然而,许多病原菌典型的形态特征很难获得。随着分子生物学技术的不断发展,根据 DNA 水平的差异进行真菌的分类鉴定和系统发育研究受到越来越多研究者的重视。目前,利用 PCR 扩增病原菌 rDNA-ITS 基因序列在病原真菌的鉴定中已得到广泛的应用(张志华和洪葵,2006)。

本研究将引起福建省福橘果实黑斑病的病原菌鉴定为子囊菌亚门座囊菌纲座囊菌科球座菌属中的柑橘球座菌 *G. citricarpa*。该结果与 Wulandari *et al.* (2009) 和林石明等(2010)的研究结果不一致。这是否与地域和品种差异有关,福建省福橘果实上是否存在柑橘黑斑病病原菌新种(亚洲种) *P. citriasiana* sp. nov 或柑橘球座菌 *G. citricarpa* 和柑橘黑斑病病原菌新种(亚洲种) *P. citriasiana* sp. nov 复合侵染的情况等,都有待进一步研究。

参考文献

陈国庆,姜丽英,徐法三. 2010. 防治柑橘黑点病药剂的离体和田间筛选. 浙江大学学报:农业与生命科学版,36(4): 440-444.

方中达. 1979. 植病研究方法. 北京:农业出版社.

胡佳,王卫芳,钟国强,荣晓东,黄河,王娟. 2010. 广东梅州蜜柑柑橘黑斑病菌的检验鉴定. 植物检疫,24(5):1-4.

兰成忠,陈庆河,汪进仕. 2008. 致病疫霉菌无毒基因 AVR3a 的克隆与序列分析. 福建农业学报,23(3):235-238.

林石明,廖富荣,方志鹏,黄蓬英,陈红运,陈青,吴媛. 2010. 漳州琯溪蜜柚果实黑斑病菌的分子鉴定. 植物检疫,24(5):13-17.

蒲占渭,黄茜斌. 2009. 台州地区柑橘黑斑病的发生状况与防治措施. 浙江柑橘,26(4):33-35.

王卫芳,钟国强,胡佳. 2008. 梅州柑橘黑斑病病原研究初报 // 彭友良,王振东. 中国植物病理学会 2008 年学术年会论文集. 北京:中国农业科学技术出版社,41.

张玉洁,杨续旺,张志信. 2010. 柑橘褐斑病的病原分离和药物筛选. 北方园艺,(14):169-171.

张志华,洪葵. 2006. 核酸序列分析在真菌鉴定方面的应用. 华南热带农业大学学报,12(2):39-43.

Koch R. 1884. Die aetiologie der tuberkulose. Mitt Kaiser Gesundh,2:1-88.

OEPP/EPPO. 2009. Specific approval and amendment of diagnostic of *Guignardia citricarpa*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin,39:318-327.

Wallingford. 2005. CAB International Crop Protection Compendium. www.cabcompendium.org/epc.

Wulandari N F, To-anun C, Hyde K D, Duong L M, de Gruyter J, Meffert J P, Groenewald J Z and Crous P W. 2009. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of citrus tan spot of *Citrus maxinma* in Asia. Fungal Diversity,34:23-39.

(责任编辑:杨郁霞)